



N 31.08.90

10 ✓

SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT CONFÉDÉRATION SUISSE CONFEDERAZIONE SVIZZERA

Bescheinigung

Die beiliegenden Akten stimmen überein mit den ursprünglichen technischen Unterlagen des auf der nächsten Seite bezeichneten Patentgesuches für die Schweiz und Liechtenstein. *

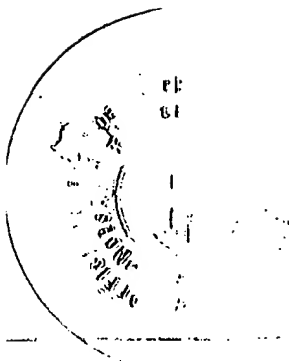
Attestation

Les documents ci-joints sont conformes aux pièces techniques originales de la demande de brevet pour la Suisse et le Liechtenstein * spécifiée à la page suivante.

Attestazione

Gli uniti documenti sono conformi agli atti tecnici originali della domanda di brevetto per la Svizzera e il Liechtenstein * specificata nella pagina seguente.

Bern, 15. Juni 1990



Bundesamt für geistiges Eigentum
Office fédéral de la propriété intellectuelle
Ufficio federale della proprietà intellettuale

Der Sektionschef / Le chef de section / Il capo di sezione

Grünig

* Die Schweiz und das Fürstentum Liechtenstein bilden ein einheitliches Schutzgebiet. Der Schutz kann deshalb nur für beide Länder gemeinsam beantragt werden.

* La Suisse et la Principauté de Liechtenstein constituent un territoire unitaire de protection. La protection ne peut donc être revendiquée que pour l'ensemble des deux États.

* La Svizzera e il Principato di Liechtenstein formano un unico territorio di protezione. La protezione può dunque essere rivendicata solamente per l'insieme dei due Stati.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

N 31.08.90

Voraussichtliche Klasse(n): C07K/A61K/C07H/C12N Patentgesuch Nr. 01 347/90-6 ✓

Patent-
bewerber: F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124
4002 Basel
Postfach
Schweiz

Titel: TNF-bindende Proteine.

Datum der
Anmeldung: 20.04.90 ✓

Priorität: -

Referenz: RAN 4105/125-002

THIS PAGE BLANK (USPTO)

N 31.08.90

F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, Basel/Schweiz

RAN 4105/125-002

5

10

TNF-bindende Proteine

15 Tumor Nekrosis Faktor α (TNF α , auch Cachectin), auf
Grund seiner haemorrhagisch-nekrotisierenden Wirkung auf
bestimmte Tumoren entdeckt, und Lymphotoxin (TNF β) sind zwei
nahe verwandte Peptidfaktoren [3] aus der Klasse der Lympho-
kine/Cytokine, die im folgenden beide als TNF bezeichnet
20 werden [siehe Uebersichtsarbeiten 2 und 3]. TNF verfügt über
ein breites zelluläres Wirkungsspektrum. Beispielsweise
besitzt TNF inhibierende oder cytotoxische Wirkung auf eine
Reihe von Tumorzelllinien [2,3], stimuliert die Prolifera-
tion von Fibroblasten und die phagozytierende/cytotoxische
25 Aktivität von myeloischen Zellen [4,5,6], induziert
Adhäsionsmoleküle in Endothelzellen oder übt eine inhibie-
rende Wirkung auf Endothel aus [7,8,9,10], inhibiert die
Synthese von spezifischen Enzymen in Adipozyten [11] und
induziert die Expression von Histokompatibilitätsantigenen
30 [12]. Manche dieser TNF-Wirkungen werden über eine Induktion
von anderen Faktoren oder durch synergistische Effekte mit
anderen Faktoren, wie beispielsweise Interferonen oder
Interleukinen erzielt [13-16].

35

AB/19.4.90

TNF ist bei einer Reihe von pathologischen Zuständen, beispielsweise Schockzuständen bei Meningococcen-Sepsis [17], bei der Entwicklung von Autoimmun-Glomerulonephritis bei Mäusen [18] oder bei cerebraler Malaria bei Mäusen [19] und beim Menschen [41] involviert. Ganz allgemein scheinen die toxischen Wirkungen von Endotoxin durch TNF vermittelt zu sein [20]. Weiterhin kann TNF wie Interleukin-1 Fieber auslösen [39]. Auf Grund der pleiotropen funktionellen Eigenschaften von TNF kann man annehmen, dass TNF in Wechselwirkung mit anderen Cytokinen bei einer ganzen Reihe weiterer pathologischer Zustände als Mediator von Immunantwort, Entzündung oder anderen Prozessen beteiligt ist.

Diese biologischen Effekte werden durch TNF über spezifische Rezeptoren vermittelt, wobei nach heutigem Wissensstand sowohl TNF α wie TNF β an die gleichen Rezeptoren binden [21]. Verschiedene Zelltypen unterscheiden sich in der Anzahl von TNF-Rezeptoren [22,23,24]. Solche ganz allgemein gesprochen TNF-bindenden Proteine (TNF-BP) wurden durch kovalente Bindung an radioaktiv markiertes TNF nachgewiesen [24-29], wobei die folgenden scheinbaren Molekulargewichte der erhaltenen TNF/TNF-BP-Komplexe ermittelt wurden: 95/100 kD und 75 kD [24], 95 kD und 75 kD [25], 138 kD, 90 kD, 75 kD und 54 kD [26], 100 \pm 5 kD [27], 97 kD und 70 kD [28] und 145 kD [29]. Mittels anti-TNF-Antikörper-Immunoaffinitätschromatographie und präparativer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) konnte ein solcher TNF/TNF-BP-Komplex isoliert werden [27]. Die reduktive Spaltung dieses Komplexes und anschließende SDS-PAGE-Analyse ergab mehrere Banden, die allerdings nicht auf TNF-Bindeaktivität getestet wurden. Da die spezifischen Bedingungen, die zu der Spaltung des Komplexes verwendet werden müssen, zur Inaktivierung des Bindeproteins führen [31], ist letzteres auch nicht möglich gewesen. Die Anreicherung von löslichen TNF-BP aus dem humanen Serum oder Urin mittels Ionenaustauscher-Chromatographie und Gelfiltration (Molekulargewichte im Bereich von 50 kD) wurde von

11.31.08.90

- 3 -

Olsson et al. beschrieben [30].

5 Brockhaus et al. [32] erhielten durch TNF α -Liganden-
affinitätschromatographie und HPLC aus Membranextrakten von
HL60-Zellen eine angereicherte TNF-BP-Präparation, die
wiederum als Antigenpräparation zur Herstellung von mono-
klonalen Antikörpern gegen TNF-BP verwendet wurde. Unter
Verwendung eines solchen immobilisierten Antikörpers (Immun-
affinitätschromatographie) wurde mittels TNF α -Liganden-
10 affinitätschromatographie und HPLC von Loetscher und
Brockhaus [31] aus einem Extrakt von humaner Placenta eine
angereicherte Präparation von TNF-BP erhalten, die in der
SDS-PAGE-Analyse eine starke breite Bande bei 35 kD, eine
schwache Bande bei etwa 40 kD und eine sehr schwache Bande
15 im Bereich zwischen 55 kD und 60 kD ergab. Im übrigen zeigte
das Gel im Bereich von 33 kD bis 40 kD einen Protein-
hintergrundschmier. Die Bedeutung der so erhaltenen Protein-
banden war jedoch im Hinblick auf die Heterogenität des
verwendeten Ausgangsmaterials (Placenta-Gewebe; vereinigt
20 Material aus mehreren Placenten) nicht klar.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind nichtlösliche
Proteine und lösliche oder nichtlösliche Fragmente davon,
die TNF binden (TNF-BP), in homogener Form, sowie deren
25 physiologisch verträgliche Salze. Bevorzugt sind solche
Proteine, die gemäss SDS-PAGE unter nicht reduzierenden
Bedingungen durch scheinbare Molekulargewichte von etwa
55 kD, 51 kD, 38 kD, 36 kD und 34 kD bzw. 75 kD und 65 kD
charakterisiert sind, insbesondere solche mit etwa 55 kD und
30 75 kD. Weiterhin bevorzugt sind solche Proteine, die durch
wenigstens eine der folgenden Aminosäureteilsequenzen
gekennzeichnet sind:

(IA) Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu-Lys-Arg-Asp-Ser-
35 Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-X-Asn-Ser-
Ile

- (IB) Ser-Thr-Pro-Glu-Lys-Glu-Gly-Glu-Leu-Glu-Gly-Thr-Thr-Thr-Lys
- (IIA) Ser-Gln-Leu-Glu-Thr-Pro-Glu-Thr-Leu-Leu-Gly-Ser-Thr-Glu-Glu-Lys-Pro-Leu
- 5 (IIB) Val-Phe-Cys-Thr
- (IIC) Asn-Gln-Pro-Gln-Ala-Pro-Gly-Val-Glu-Ala-Ser-Gly-Ala-Gly-Glu-Ala
- (IID) Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-X-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys
- 10 (IIE) Ile-X-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Pro-Ala-Leu-Glu
- (IIF) Leu-Cys-Ala-Pro
- (IIG) Val-Pro-His-Leu-Pro-Ala-Asp
- (IIH) Gly-Ser-Gln-Gly-Pro-Glu-Gln-Gln-X-X-Leu-Ile-X-Ala-Pro
- 15 wobei X für einen Aminosäurerest steht, der nicht eindeutig bestimmt werden konnte.

Im Stand der Technik sind bereits TNF-BP durch eine N-terminale Teilsequenz charakterisiert worden [Europäische
 20 Patentanmeldung mit der Publikations-Nr. 308 378], wobei sich diese Sequenz von der erfindungsgemässen N-terminalen Teilsequenz gemäss Formel (IA) unterscheidet. Im übrigen handelt es sich aber bei den im Stand der Technik beschriebenen TNF-Bindeproteinen um aus dem Urin isolierte,
 25 lösliche, d.h. nicht membrangebundene, TNF-BP und nicht um membrangebundene, d.h. unlösliche, TNF-BP.

Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind auch Verfahren zur Isolierung der erfindungsgemässen TNF-BP. Diese
 30 Verfahren sind dadurch charakterisiert, dass man im wesentlichen die folgenden Reinigungsschritte nacheinander ausführt: Herstellung eines Zell- oder Gewebeextraktes, Immunaффinitätschromatographie und/oder ein- oder mehrfache Ligandaффinitätschromatographie, hochauflösende Flüssig-
 35 keitschromatographie (HPLC) und präparative SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Kombination der aus

11.08.90

- 5 -

dem Stand der Technik bekannten einzelnen Reinigungsschritte ist für den Erfolg des erfindungsgemässen Verfahrens essentiell, wobei einzelne Schritte im Rahmen der zu lösenden Aufgabe modifiziert und verbessert wurden. So wurde
5 beispielsweise der ursprünglich für die Anreicherung von TNF-BP aus humaner Placenta [31] verwendete kombinierte Immunaффinitätschromatographie/TNF α -Ligandenaffinitätschromatographie-Schritt dadurch abgeändert, dass eine BSA-Sepharose 4B-Vorsäule verwendet wurde. Diese Vorsäule wurde zum
10 Auftrag des Zell- oder Membranextraktes in Reihe mit der Immunaффinitätssäule und gefolgt von der Ligandenaffinitätssäule geschaltet. Nach Auftrag des Extraktes wurden die beiden zuletztgenannten Säulen abgekoppelt, jede für sich eluiert und die TNF-BP-aktiven Fraktionen wurden nochmals
15 über eine Ligandenaffinitätssäule gereinigt. Erfindungswesentlich für die Durchführung des Umkehrphasen-HPLC-Schrittes ist die Verwendung eines Detergens-haltigen Lösungsmittelgemisches.

20 Ferner ist auch ein technisches Verfahren zum Erzielen hoher Zelldichten von Säugerzellen, aus denen TNF-BP isoliert werden können, Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ein solches Verfahren zeichnet sich dadurch aus, dass ein Medium, welches für die spezifischen Wachstumserfordernisse
25 der verwendeten Zelllinie entwickelt wurde, in Verbindung mit einer wie z.B. im Detail in Beispiel 2 beschriebenen Perfusionsapparatur verwendet wird. Mittels eines solchen Verfahrens lassen sich beispielsweise für HL-60-Zellen bis zu mehr als 20-fach höhere Zelldichten als üblich erzielen.

30 Zusätzlich dazu betrifft die vorliegende Erfindung auch DNA-Sequenzen, die für Proteine und lösliche oder nicht-lösliche Fragmente davon, die TNF binden, kodieren. Bevorzugt sind einmal DNA-Sequenzen, welche für ein solches
35 Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von etwa 55 kD kodieren, wobei die in Abbildung 1 dargestellte Sequenz besonders bevorzugt ist, wie Sequenzen, die für nicht-

lösliche wie lösliche Fragmente von solchen Proteinen kodieren. Eine besonders bevorzugte DNA-Sequenz, die für ein nichtlösliches Protein-Fragment kodiert, reicht von Nukleotid -185 bis 1122 der in Abbildung 1 gezeigten Sequenz. Besonders bevorzugte DNA-Sequenzen, die für lösliche Protein-Fragmente kodieren, sind solche, die von Nukleotid -185 bis 633 bzw. von Nukleotid -14 bis 633 der in Abbildung 1 gezeigten Sequenz reichen. Bevorzugt sind ebenfalls DNA-Sequenzen, die für ein Protein von etwa 75/65 kD kodieren und die die in Figur 4 dargestellte partielle cDNA-Sequenzen enthalten. Besonders bevorzugte DNA-Sequenzen sind in diesem Fall die Sequenzen des offenen Leserasters von Nukleotid 2 bis 1'177. Die Peptide IIA, IIC, IIE, IIF, IIG und IIH werden von der partiellen cDNA-Sequenz in Figur 4 kodiert, wobei die geringfügigen Abweichungen der experimentell bestimmten Aminosäuresequenzen von der von der cDNA abgeleiteten Sequenz mit höchster Wahrscheinlichkeit auf der geringeren Auflösung der Gasphasen-Sequenzierung beruhen. Die vorliegende Erfindung betrifft natürlich auch die von solchen DNA-Sequenzen kodierten rekombinanten Proteine. Selbstverständlich sind dabei auch solche Proteine umfasst, in deren Aminosäuresequenzen, beispielsweise mittels gezielter Mutagenese, Aminosäuren so ausgetauscht worden sind, dass dadurch die Aktivität der TNF-BP oder deren Fragmente, nämlich die Bindung von TNF oder die Wechselwirkung mit anderen, an der Signalübertragung beteiligten Membrankomponenten, in einer gewünschten Art verändert oder erhalten wurden. Aminosäureaustausche in Proteinen und Peptiden, die im allgemeinen die Aktivität solcher Moleküle nicht verändern, sind im Stand der Technik bekannt und beispielsweise von H. Neurath und R.L. Hill in "The Proteins" (Academic Press, New York, 1979, siehe besonders Figur 6, Seite 14) beschrieben. Die am häufigsten vorkommenden Austausche sind: Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly, sowie solche in umgekehrter Weise. Die

vorliegende Erfindung betrifft ferner Vektoren, die erfindungsgemässe DNA-Sequenzen enthalten und zur Transformation von geeigneten pro- wie eukaryotischen Wirtssystemen geeignet sind, wobei solche Vektoren bevorzugt
 5 sind, deren Verwendung zur Expression der von den erfindungsgemässen DNA-Sequenzen kodierten Proteine führt. Schliesslich betrifft die vorliegende Erfindung auch noch mit solchen Vektoren transformierte pro- wie eukaryotische Wirtssysteme, wie Verfahren zur Herstellung von erfindungs-
 10 gemässen rekombinanten Verbindungen durch Kultivierung solcher Wirtssysteme und anschliessende Isolierung dieser Verbindungen aus den Wirtssystemen selbst oder deren Kultur-
 überständen.

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch pharmazeutische Präparate, die wenigstens eines dieser TNF-BP oder Fragmente davon, gewünschtenfalls in Verbindung mit weiteren pharmazeutisch wirksamen Substanzen und/oder nicht-toxi-
 schen, inerten, therapeutisch verträglichen Trägermaterialien enthalten.
 20

Die vorliegende Erfindung betrifft schliesslich die Verwendung solcher TNF-BP einerseits zur Herstellung pharmazeutischer Präparate bzw. andererseits zur Behandlung von
 25 Krankheiten, bevorzugt solchen, in deren Verlauf TNF involviert ist.

Ausgangsmaterial für die erfindungsgemässen TNF-BP sind ganz allgemein Zellen, die solche TNF-BP in membrangebundener Form enthalten und die dem Fachmann ohne Beschränkungen
 30 allgemein zugänglich sind, wie beispielsweise HL60- [ATCC Nr. CCL 240], U 937- [ATCC Nr. CRL 1593], SW 480- [ATCC Nr. CCL 228] und HEp2-Zellen [ATCC Nr. CCL 23]. Diese Zellen können nach bekannten Methoden des Standes der Technik [40]
 35 oder zum Erzielen hoher Zelldichten nach dem bereits allgemein und im Detail für HL60-Zellen in Beispiel 2 beschriebenen Verfahren kultiviert werden. TNF-BP können dann nach

bekannten Methoden des Standes der Technik mittels geeigneter Detergenzien, beispielsweise Triton X-114, 1-O-n-Octyl- β -D-glucopyranosid (Octylglucosid), oder 3-[(3-Cholylamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat (CHAPS), im
 5 besonderen mittels Triton X-100, aus den aus dem Medium abzentrifugierten und gewaschenen Zellen extrahiert werden. Zum Nachweis solcher TNF-BP können die üblicherweise verwendeten Nachweismethoden für TNF-BP, beispielsweise eine Poly-
 10 äthylenglykol-induzierte Fällung des 125 I-TNF/TNF-BP-Komplexes [27], im besonderen Filterbindungstests mit radioaktiv markiertem TNF gemäss Beispiel 1, verwendet werden. Zur Gewinnung der erfindungsgemässen TNF-BP können die
 15 generell zur Reinigung von Proteinen, insbesondere von Membranproteinen, verwendeten Methoden des Standes der Technik, wie beispielsweise Ionenaustausch-Chromatographie, Gelfiltration, Affinitätschromatographie, HPLC und SDS-PAGE
 20 verwendet werden. Besonders bevorzugte Methoden zur Herstellung erfindungsgemässer TNF-BP sind Affinitätschromatographie, insbesondere mit TNF- α als an die Festphase gebundenen Liganden und Immunaффinitätschromatographie, HPLC
 und SDS-PAGE. Die Elution von mittels SDS-PAGE aufgetrennten TNF-BP Banden kann nach bekannten Methoden der Proteinchemie erfolgen, beispielsweise mittels Elektroelution nach
 25 Hunkapiller et al. [34], wobei nach heutigem Stand des Wissens die dort angegebenen Elektro-Dialysezeiten generell zu verdoppeln sind. Danach noch verbleibende Spuren von SDS können dann gemäss Bosserhoff et al. [50] entfernt werden.

Die so gereinigten TNF-BP können mittels der im Stand
 30 der Technik bekannten Methoden der Peptidchemie, wie beispielsweise N-terminale Aminosäuresequenzierung oder enzymatische wie chemische Peptidspaltung charakterisiert werden. Durch enzymatische oder chemische Spaltung erhaltene
 Fragmente können nach gängigen Methoden, wie beispielsweise
 35 HPLC, aufgetrennt und selbst wieder N-terminal sequenziert werden. Solche Fragmente, die selbst noch TNF binden, können mittels der obengenannten Nachweismethoden für TNF-BP

identifiziert werden und sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Ausgehend von der so erhältlichen Aminosäuresequenz-
 5 information oder den in Figur 1 dargestellten DNA- wie
 Aminosäuresequenzen können unter Beachtung der Degeneration
 des genetischen Codes nach im Stand der Technik bekannten
 Methoden geeignete Oligonukleotide hergestellt werden [51].
 Mittels dieser können dann wiederum nach bekannten Methoden
 10 der Molekularbiologie [42,43] cDNA- oder genomische
 DNA-Banken nach Klonen, die für TNF-BP kodierende Nuklein-
 säuresequenzen enthalten, abgesucht werden. Ausserdem können
 mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [49] cDNA-Frag-
 mente kloniert werden, indem von zwei auseinanderliegenden,
 15 relativ kurzen Abschnitten der Aminosäuresequenz unter
 Beachtung des genetischen Codes vollständig degenerierte und
 in ihrer Komplementarität geeignete Oligonucleotide als
 "Primer" eingesetzt werden, wodurch das zwischen diesen
 beiden Sequenzen liegende Fragment amplifiziert und identi-
 20 fiziert werden kann. Die Bestimmung der Nukleotidsequenz
 eines derartigen Fragmentes ermöglicht eine unabhängige
 Bestimmung der Aminosäure-Sequenz des Proteinfragments, für
 das es kodiert. Die mittels der PCR erhältlichen cDNA-Frag-
 mente können ebenfalls, wie bereits für die Oligonukleotide
 25 selbst beschrieben, nach bekannten Methoden zum Aufsuchen
 von für TNF-BP kodierende Nukleinsäuresequenzen enthaltenden
 Klonen aus cDNA- bzw. genomische DNA-Banken verwendet
 werden. Solche Nukleinsäuresequenzen können dann nach
 bekannten Methoden sequenziert werden [42]. Aufgrund der so
 30 bestimmten wie der für bestimmte Rezeptoren bereits bekann-
 ten Sequenzen, können solche Teilsequenzen, die für lösliche
 TNF-BP-Fragmente kodieren, bestimmt und mittels bekannter
 Methoden aus der Gesamtsequenz herausgeschnitten werden [42].

35 Die gesamte Sequenz oder solche Teilsequenzen können
 dann mittels bekannter Methoden in im Stand der Technik
 beschriebene Vektoren zu deren Vervielfältigung wie Expres-

sion in Prokaryoten integriert werden [42]. Geeignete prokaryotische Wirtsorganismen stellen beispielsweise gram-negative wie gram-positive Bakterien, wie beispielsweise E. coli Stämme, wie E. coli HB 101 [ATCC Nr. 33 694] oder
5 E. coli W3110 [ATCC Nr. 27 325] oder B. subtilis Stämme dar.

Weiterhin können erfindungsgemässe Nukleinsäuresequenzen, die für TNF-BP sowie für TNF-BP-Fragmente kodieren, in geeignete Vektoren zur Vermehrung wie Expression in
10 eukaryotischen Wirtszellen, wie beispielsweise Hefe, Insekten- und Säugerzellen, mittels bekannter Methoden integriert werden. Expression solcher Sequenzen erfolgt bevorzugt in Säuger- wie Insektenzellen.

Ein typischer Expressionsvektor für Säugerzellen enthält
15 ein effizientes Promotorelement, um eine gute Transkriptionsrate zu erzielen, die zu exprimierende DNA-Sequenz und Signale für eine effiziente Termination und Polyadenylierung des Transkripts. Weitere Elemente, die verwendet werden
20 können, sind "Enhancer", welche zu nochmals verstärkter Transkription führen und Sequenzen, welche z.B. eine längere Halbwertszeit der mRNA bewirken können.

Die meisten Vektoren, die für eine transiente Expression
25 einer bestimmten DNA-Sequenz in Säugerzellen verwendet werden, enthalten den Replikationsursprung des SV40 Virus. In Zellen, die das T-Antigen des Virus exprimieren, (z.B. COS-Zellen), werden diese Vektoren stark vermehrt. Eine vorübergehende Expression ist aber nicht auf COS-Zellen
30 beschränkt. Im Prinzip kann jede transfektierbare Säugerzelllinie hierfür verwendet werden. Signale, die eine starke Transkription bewirken können, sind z.B. die frühen und späten Promotoren von SV40, der Promoter und Enhancer des "major immediate-early" Gens des HCMV (humaner Cytomegalovirus), die LTRs ("long terminal repeats") von Retroviren,
35 wie beispielsweise RSV, HIV und MMTV. Es können aber auch Signale von zellulären Genen, wie z.B. die Promotoren des

Aktin- und Collagenase-Gens, verwendet werden.

Alternativ können aber auch stabile Zelllinien, die die spezifische DNA-Sequenz im Genom (Chromosom) integriert haben, erhalten werden. Hierzu wird die DNA-Sequenz zusammen mit einem selektierbaren Marker, z.B. Neomycin, Hygromycin, Dihydrofolat-Reduktase (dhfr) oder Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (hgpt) kotransfiziert. Die stabil ins Chromosom eingebaute DNA-Sequenz kann auch noch stark vermehrt werden. Ein geeigneter Selektionsmarker hierfür ist beispielsweise die Dihydrofolat-Reduktase (dhfr). Säugerzellen (z.B. CHO-Zellen), welche kein intaktes dhfr-Gen enthalten, werden hierbei nach erfolgter Transfektion mit steigenden Mengen von Methotrexat inkubiert. Auf diese Weise können Zelllinien erhalten werden, welche mehr als tausend Kopien der gewünschten DNA-Sequenz enthalten.

Säugerzellen, welche für die Expression verwendet werden können, sind z.B. Zellen der menschlichen Zelllinien Hela [ATCC CCL2] und 293 [ATCC CRL 1573], sowie 3T3- [ATCC CCL 163] und L-Zellen, z.B. [ATCC CCL 149], (CHO)-Zellen [ATCC CCL 61], BHK [ATCC CCL 10]-Zellen sowie die CV 1 [ATCC CCL 70]- und die COS-Zelllinien [ATCC CRL 1650, CRL 1651].

Geeignete Expressionsvektoren umfassen beispielsweise Vektoren wie pBC12MI [ATCC 67 109], pSV2dhfr [ATCC 37 146], pSVL [Pharmacia, Uppsala, Sweden], pRSVcat [ATCC 37 152] und pMSG [Pharmacia, Uppsala, Sweden]. Besonder bevorzugte Vektoren sind die in Beispiel 9 verwendeten Vektoren "pK19" und "pN123". Diese können aus den mit ihnen transformierten E. coli-Stämmen HB101(pK19) und HB101(pN123) nach bekannten Methoden isoliert werden [42]. Diese E. coli-Stämme wurden am 26. Januar 1990 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig, BRD unter DSM 5761 für HB101(pK19) und DSM 5764 für HB101(pN123) hinterlegt.

Die Art und Weise wie die Zellen transfektiert werden hängt vom gewählten Expressions- und Vektorsystem ab. Eine Uebersicht über diese Methoden findet man z.B. bei Pollard et al., "DNA Transformation of Mammalian Cells" in "Methods in Molecular Biology" [Nucleic Acids Vol. 2, 1984, Walker, J.M., ed, Humana, Clifton, New Jersey]. Weitere Methoden findet man bei Chen und Okayama ["High-Efficiency Transformation of Mammalian Cells by Plasmid DNA", Molecular and Cell Biology 7, 2745-2752, 1987] und bei Felgner [Felgner et al., "Lipofectin: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure", Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417, 1987].

Zur Expression in Insektenzellen kann das Baculovirus-Expressions-System, welches schon für die Expression einer Reihe von Proteinen erfolgreich eingesetzt worden ist (für eine Uebersicht siehe Luckow and Summers, Bio/Technology 6, 47-55, 1988), verwendet werden. Rekombinante Proteine können authentisch oder als Fusionsproteine hergestellt werden. Die so hergestellten Proteine können auch modifiziert, wie beispielsweise glykosyliert (Smith et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82, 8404-8408, 1987) sein. Für die Herstellung eines rekombinanten Baculovirus, der das gewünschte Protein exprimiert, verwendet man einen sogenannten "Transfervektor". Hierunter versteht man ein Plasmid, welches die heterologe DNA-Sequenz unter der Kontrolle eines starken Promoters, z.B. dem des Polyhedringens, enthält, wobei diese auf beiden Seiten von viralen Sequenzen umgeben ist. Besonders bevorzugte Vektoren sind die in Beispiel 10 verwendeten Vektoren "pN113", "pN119" und "pN124". Diese können aus den mit ihnen transformierten E. coli-Stämmen HB101(pN113), HB101(pN119) und HB101(pN124) nach bekannten Methoden isoliert werden [42]. Diese E. coli-Stämme wurden am 26. Januar 1990 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig, BRD, unter DSM 5762 für HB101(pN113), DSM 5763 für HB101(pN119) und DSM 5765 für HB101(pN124) hinterlegt. Der Transfervektor wird dann

zusammen mit DNA des Wildtyp-Baculovirus in die Insektenzellen transfektiert. Die in den Zellen durch homologe Rekombination entstehenden rekombinanten Viren können dann nach bekannten Methoden identifiziert und isoliert werden.
 5 Eine Uebersicht über das Baculovirus-Expressionssystem und der dabei verwendeten Methoden findet man bei Luckow und Summers [52].

10 Exprimierte TNF-BP wie ihre nichtlöslichen oder löslichen Fragmente können dann nach im Stand der Technik bekannten Methoden der Proteinchemie, wie beispielsweise den bereits auf Seiten 5-6 beschriebenen Verfahren, aus der Zellmasse oder den Kulturüberständen gereinigt werden.

15 Die erfindungsgemäss erhaltenen TNF-BP können auch als Antigene zur Erzeugung von poly- und monoklonalen Antikörpern nach bekannten Methoden der Technik [44,45] oder gemäss dem in Beispiel 3 beschriebenen Verfahren verwendet werden. Solche Antikörper, insbesondere monoklonale Antikörper gegen die 75 kD-TNF-BP-Spezies, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Solche gegen die 75 kD TNF-BP gerichtete Antikörper können durch dem Fachmann geläufige Modifikationen des in den Beispielen 4-6 im Detail beschriebenen Reinigungsverfahrens zur Isolierung von TNF-BP
 25 eingesetzt werden.

Auf Grund der hohen Bindungsaffinität erfindungsgemässer TNF-BP für TNF (K_d -Werte in den Grössenordnungen von 10^{-9} - 10^{-10} M) können diese oder Fragmente davon als
 30 Diagnostika zum Nachweis von TNF in Serum oder anderen Körperflüssigkeiten nach im Stand der Technik bekannten Methoden, beispielsweise in Festphasenbindungstests oder in Verbindung mit Anti-TNF-BP-Antikörpern in sogenannten "Sandwich"-Tests, eingesetzt werden.

35

Im übrigen können erfindungsgemässe TNF-BP einerseits zur Reinigung von TNF und andererseits zum Auffinden von

TNF-Agonisten sowie TNF-Antagonisten nach im Stand der Technik bekannten Verfahren verwendet werden.

Die erfindungsgemässen TNF-BP sowie deren physiologisch verträgliche Salze, die nach im Stand der Technik bekannten Methoden hergestellt werden können, können auch zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten, vor allem solchen zur Behandlung von Krankheiten, bei deren Verlauf TNF involviert ist, verwendet werden. Dazu kann eine oder mehrere der genannten Verbindungen, falls wünschenswert bzw. erforderlich in Verbindung mit anderen pharmazeutisch aktiven Substanzen, mit den üblicherweise verwendeten festen oder flüssigen Trägermaterialien in bekannter Weise verarbeitet werden. Die Dosierung solcher Präparate kann unter Berücksichtigung der üblichen Kriterien in Analogie zu bereits verwendeten Präparaten ähnlicher Aktivität und Struktur erfolgen.

Nachdem die Erfindung vorstehend allgemein beschrieben worden ist, sollen die folgenden Beispiele Einzelheiten der Erfindung veranschaulichen, ohne dass diese dadurch in irgendeiner Weise eingeschränkt wird.

Beispiel 1

25

Nachweis von TNF-bindenden Proteinen

Die TNF-BP wurden in einem Filtertest mit humanem radiojodiertem ¹²⁵I-TNF nachgewiesen. TNF (46.47) wurde mit Na¹²⁵I (IMS40, Amersham, Amersham, England) und Iodo-Gen (#28600, Pierce Eurochemie, Oud-Beijerland, Niederlande) nach Fraker und Speck [48] radioaktiv markiert. Zum Nachweis der TNF-BP wurden isolierte Membranen der Zellen oder ihre solubilisierten, angereicherten und gereinigten Fraktionen auf angefeuchtete Nitrocellulose-Filter (0.45 µ, BioRad, Richmond, California, USA) aufgetragen. Die Filter wurden dann in Pufferlösung mit 1% entfettetem Milchpulver

- blockiert und anschliessend mit $5 \cdot 10^5$ cpm/ml ^{125}I -TNF α (0.3 - $1.0 \cdot 10^8$ cpm/ μg) in zwei Ansätzen mit und ohne Beigabe von $5 \mu\text{g/ml}$ nicht-markiertem TNF α inkubiert, gewaschen und luftgetrocknet. Die gebundene Radioaktivität wurde autoradiographisch semiquantitativ nachgewiesen oder in einem γ -Counter gezählt. Die spezifische ^{125}I -TNF- α -Bindung wurde nach Korrektur für unspezifische Bindung in Anwesenheit von unmarkiertem TNF- α im Ueberschuss ermittelt. Die spezifische TNF-Bindung im Filtertest wurde bei verschiedenen TNF-Konzentrationen gemessen und nach Scatchard analysiert [33], wobei ein K_d -Wert von $\sim 10^{-9}$ - 10^{-10} M ermittelt wurde.

15

Beispiel 2

Zelllextrakte von HL-60-Zellen

- HL60 Zellen [ATCC-Nr. CCL 240] wurden in experimentellem Labormasstab in einem RPMI 1640-Medium [GIBCO-Katalog Nr. 074-01800], das noch 2 g/l NaHCO_3 und 5% fötales Kälberserum enthielt, in einer 5% CO_2 -Atmosphäre kultiviert und anschliessend zentrifugiert.
- Zum Erzielen hoher Zelldichten in technischem Masstab wurde folgendermassen verfahren. Die Züchtung wurde in einem 75 l Airliftfermenter (Fa. Chemap, Schweiz) mit 58 l Arbeitsvolumen durchgeführt. Hierfür wurde das Kassettenmembransystem "PROSTAK" (Millipore, Schweiz) mit einer Membranfläche von $0,32 \text{ m}^2$ (1 Kassette) in den äusseren Zirkulationskreislauf integriert. Das Kulturmedium (siehe Tabelle 1) wurde mit einer Watson-Marlow Pumpe, Typ 603U, mit 5 l/min. umgepumpt. Nach einer Dampfsterilisation der Anlage, wobei das "PROSTAK" System im Autoklaven separat sterilisiert wurde, wurde die Fermentation mit wachsenden HL-60 Zellen aus einem 20 l Airliftfermenter (Chemap) gestartet. Die Zellzüchtung im Impffermenter erfolgte im

5

15

35

Komponenten	Konzentrationen
	mg/l
CaCl_2 (wasserfrei)	112,644
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	20
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$0,498 \cdot 10^{-3}$
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1668

	KCl	336,72
	KNO ₃	0,0309
	MgCl ₂ (wasserfrei)	11,444
	MgSO ₄ (wasserfrei)	68,37
5	NaCl	5801,8
	Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	188,408
	NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	75
	Na ₂ SeO ₃ •5H ₂ O	9,6•10 ⁻³
	ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,1726
10	D-Glucose	4000
	Glutathion (red.)	0,2
	Hepes-Puffer	2383,2
	Hypoxanthin	0,954
15	Linolsäure	0,0168
	Liponsäure	0,042
	Phenolrot	10,24
	Putrescin 2HCl	0,0322
	Na-Pyruvat	88
20	Thymidin	0,146
	Biotin	0,04666
	D-Ca-Pantothenat	2,546
	Cholinchlorid	5,792
	Folsäure	2,86
25	i-Inositol	11,32
	Niacinamid	2,6
	Nicotinamid	0,0074
	para-Aminobenzoessäure	0,2
	Pyridoxal HCl	2,4124
30	Pyridoxin HCl	0,2
	Riboflavin	0,2876
	Thiamin HCl	2,668
	Vitamin B ₁₂	0,2782
35	L-Alanin	11,78
	L-Asparaginsäure	10
	L-Asparagin H ₂ O	14,362

Das Zentrifugat wurde mit isotonem Phosphatpuffer (PBS;
35 0.2 g/l KCl, 0.2 g/l KH_2PO_4 , 8.0 g/l NaCl, 2.16 g/l
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), der mit 5% Dimethylformamid, 10 mM
Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin, 10 μM Leupeptin, 1 μM

Das Zentrifugat wurde mit isotonem Phosphatpuffer (PBS;
35 0.2 g/l KCl, 0.2 g/l KH_2PO_4 , 8.0 g/l NaCl, 2.16 g/l
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), der mit 5% Dimethylformamid, 10 mM
Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin, 10 μM Leupeptin, 1 μM

Pepstatin, 1 mM o-Phenanthrolin, 5 mM Jodacetamid, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid versetzt war (im folgenden als PBS-M bezeichnet), gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden bei einer Dichte von $2,5 \cdot 10^8$ Zellen/ml in PBS-M mit
 5 Triton X-100 (Endkonzentration 1,0%) extrahiert. Der Zell-extrakt wurde durch Zentrifugation geklärt ($15'000 \times g$, 1 Stunde; $100'000 \times g$, 1 Stunde).

Beispiel 3

10

Herstellung von monoklonalen (TNF-BP)-Antikörpern

Ein gemäss Beispiel 2 erhaltener Zentrifugationsüberstand aus Kultivierung von HL60-Zellen im experimentellen
 15 Labormasstab wurde im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt. Der verdünnte Ueberstand wurde bei 4°C auf eine Säule aufgetragen (Flussrate: 0,2 ml/min.), die 2 ml Affigel 10 enthielt (Bio Rad Katalog Nr. 153-6099), an das 20 mg rekombinantes humanes TNF- α [Pennica, D. et al. (1984) Nature
 20 312, 724; Shirai, T. et al. (1985) Nature 313, 803; Wang, A.M. et al. (1985) Science 228, 149] gemäss den Empfehlungen des Herstellers gekoppelt worden war. Die Säule wurde bei 4°C und einer Durchflussrate von 1 ml/min zuerst mit 20 ml PBS, das 0,1% Triton X 114 enthielt und danach mit 20 ml PBS
 25 gewaschen. So angereichertes TNF-BP wurde bei 22°C und einer Flussrate von 2 ml/min mit 4 ml 100 mM Glycin, pH 2.8, 0,1% Decylmaltosid eluiert. Das Eluat wurde in einer Centricon 30 Einheit [Amicon] auf 10 μ l konzentriert.

30

10 μ l dieses Eluates wurden mit 20 μ l vollständigem Freundschens Adjuvans zu einer Emulsion gemischt. Je 10 μ l der Emulsion wurden gemäss dem von Holmdahl, R. et al. [(1985), J. Immunol. Methods 83, 379] beschriebenen Verfahren an den Tagen 0, 7 und 12 in eine hintere Fusspfote
 35 einer narkotisierten Balb/c-Maus injiziert.

Die Antikörper zeichnen sich aus durch ihre inhibierende Wirkung auf die TNF-Bindung an HL60-Zellen oder durch ihre Bindung an Antigen im Filtertest gemäss Beispiel 1. Zum Nachweis der biologischen Aktivität von anti(TNF-BP)-Antikörpern wurde folgendermassen verfahren: 5×10^6 HL60 oder U937-Zellen wurden in vollständigem RPMI 1640 Medium zusammen mit affinitätsgereinigten monoklonalen anti-(TNF-BP)-Antikörpern oder Kontrollantikörpern (d.h. solchen, die nicht gegen TNF-BP gerichtet sind) in einem Konzentrationsbereich von 1 ng/ml bis 10 µg/ml inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch Zentrifugation gesammelt und mit 4,5 ml PBS bei 0°C gewaschen. Sie wurden in 1 ml vollständigem RPMI 1640 Medium

- (Beispiel 2), das zusätzlich 0,1% Natriumazid und ^{125}I -TNF α (10^6 cpm/ml) mit oder ohne Beigabe von unmarkiertem TNF α (s.o.) enthielt, resuspendiert. Die spezifische Radioaktivität des ^{125}I -TNF α betrug 700 Ci/mmol.
- 5 Die Zellen wurden 2 Stunden bei 4°C inkubiert, gesammelt und 4 mal mit 4,5 ml PBS, das 1% BSA und 0,001% Triton X 100 (Fluka) enthielt, bei 0°C gewaschen. Die an die Zellen gebundene Radioaktivität wurde in einem γ -Scintillationszähler gemessen. In einem vergleichbaren Experiment wurde
- 10 die zellgebundene Radioaktivität von Zellen, die nicht mit anti-(TNF-BP)-Antikörpern behandelt worden waren, bestimmt (ungefähr 10 000 cpm/ 5×10^6 Zellen).

Beispiel 4

15

Affinitätschromatographie

- Für die weitere Reinigung wurden jeweils ein gemäss Beispiel 3 erhaltener monoklonaler anti-(55 kD TNF-BP)-Antikörper (2,8 mg/ml Gel), TNF α (3,0 mg/ml Gel) und Rinder-
- 20 serumalbumin (BSA, 8,5 mg/ml Gel) gemäss den Vorschriften des Herstellers kovalent an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Schweden) gekoppelt. Der gemäss
- 25 Beispiel 2 erhaltene Zellextrakt wurde über die so hergestellten und in der folgenden Reihenfolge hintereinandergeschalteten Säulen geleitet: BSA-Sepharose-Vorsäule, Immuna-
- 30 affinitätssäule [Anti-(55 kD-TNF-BP)-Antikörper], TNF α -Ligand-Affinitätssäule. Nach vollständigem Auftrag wurden die beiden letztgenannten Säulen abgetrennt und einzeln für
- sich mit je 100 ml der folgenden Pufferlösungen gewaschen: (1) PBS, 1,0% Triton X-100, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin; (2) PBS, 0,1% Triton X-100, 0,5M NaCl, 10 mM ATP, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin; und (3) PBS, 0,1% Triton X-100, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin. Sowohl
- 35 die Immun- als auch die TNF α -Ligand-Affinitätssäule wurden dann mit 100 mM Glycin pH 2,5, 100 mM NaCl, 0,2% Decylmaltoside, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin jede für

sich eluiert. Die im Filtertest gemäss Beispiel 1 aktiven Fraktionen jeder Säule wurden danach jeweils vereint und mit 1M Tris pH 8,0 neutralisiert.

- 5 Die so vereinten TNF-BP-aktiven Fraktionen der Immun-Affinitätschromatographie einerseits und der TNF α -Ligand-Affinitätschromatographie andererseits wurden zur weiteren Reinigung nochmals auf je eine kleine TNF α -Ligand-Affinitätssäule aufgetragen. Danach wurden diese beiden Säulen mit
10 je 40 ml von (1) PBS, 1,0% Triton X-100, 10 mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin, (2) PBS, 0,1% Triton X-100, 0,5M NaCl, 10 mM ATP, 10mM Benzamidin, 100 E/ml Aprotinin, (3) PBS, 0,1% Triton X-100, (4) 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1,0% NP-40, 1,0% Desoxycholat, 0,1% SDS, (5) PBS, 0,2% Decyl-
15 maltosid gewaschen. Anschliessend wurden die Säulen mit 100 mM Glycin pH 2.5, 100 mM NaCl, 0,2% Decylmaltosid eluiert. Fraktionen von 0,5 ml von jeder Säule wurden für sich gesammelt und die gemäss Filtertest (Beispiel 1) aktiven Fraktionen von jeder Säule jeweils für sich vereint
20 und in einer Centricon-Einheit (Amicon, Molekulargewichts-Ausschluss 10'000) aufkonzentriert.

Beispiel 5

25 Auftrennung mittels HPLC

- Die gemäss Beispiel 4 erhaltenen aktiven Fraktionen wurden gemäss ihrer unterschiedlichen Herkunft (Immun- bzw. Ligand-Affinitätschromatographie) jeweils für sich auf C1/C8
30 Umkehrphasen-HPLC-Säulen (ProRPC, Pharmacia, 5x20 mm), die mit 0,1% Trifluoressigsäure, 0,1% Octylglucosid equilibriert worden waren, aufgetragen. Die Säulen wurden dann mit einem linearen Acetonitril-Gradienten (0-80%) im gleichen Puffer bei einem Fluss von 0.5 ml/min eluiert. Fraktionen von
35 1.0 ml wurden von jeder Säule gesammelt und die aktiven Fraktionen von jeder Säule für sich vereint (Nachweis gemäss Beispiel 1).

Beispiel 6

Auftrennung mittels SDS-PAGE

5 Die gemäss Beispiel 5 erhaltenen und gemäss Filtertest
(Beispiel 1) aktiven Fraktionen wurden durch SDS-PAGE gemäss
[34] weiter aufgetrennt. Dazu wurden die Proben in SDS-
-Probenpuffer während 3 Minuten auf 95°C erhitzt und
anschliessend auf einem 12% Acrylamid-Trenngel mit einem
10 5%igen Sammelgel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Referenz
zur Bestimmung der scheinbaren Molekulargewichte auf dem
SDS-PAGE Gel wurden die folgenden Eichproteine verwendet:
Phosphorylase B (97,4 kD), BSA (66,2 kD), Ovalbumin
(42,7 kD), Carboanhydrase (31,0 kD), Soya Trypsin-Inhibitor
15 (21,5 kD) und Lysozym (14,4 kD).

Unter den genannten Bedingungen wurden für Proben, die
gemäss Beispiel 4 durch TNF- α -Ligandenaffinitätschromato-
graphie von Immunaaffinitätschromatographieeluat erhalten
20 und durch HPLC gemäss Beispiel 5 weiter aufgetrennt worden
waren, zwei Banden von 55 kD und 51 kD sowie drei schwächere
Banden von 38 kD, 36 kD und 34 kD erhalten. Diese Banden
wurden in einem Mini Trans Blot System (BioRad, Richmond,
California, USA) elektrophoretisch während 1 Stunde bei
25 100 V in 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol auf eine
PVDF-Membran (Immobilon, Millipore, Bedford, Mass. USA)
transferiert. Danach wurde die PVDF-Membran entweder mit
0,15% Serva-Blau (Serva, Heidelberg, BRD) in Methanol/Was-
ser/Eisessig (50/40/10 Volumenteile) auf Protein gefärbt
30 oder mit entfettetem Milchpulver blockiert und anschliessend
zum Nachweis von Banden mit TNF-BP-Aktivität mit ¹²⁵I-
-TNF α gemäss den in Beispiel 1 beschriebenen Filtertest-
bedingungen inkubiert. Dabei zeigte sich, dass alle in der
Proteinfärbung zur Darstellung gelangten Banden spezifisch
35 TNF α banden. Alle diese Banden banden im Western Blot nach
Towbin et al. [38] auch den gemäss Beispiel 3 hergestellten
monoklonalen Anti-55kD-TNF-BP-Antikörper. Dabei wurde ein

gemäss dem in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren mit
Na¹²⁵I radioaktiv markierter, affinitätsgereinigter
(Mausimmunglobulin-Sepharose-4B-Affinitätssäule)
Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin-Antikörper zum
5 autoradiographischen Nachweis dieses Antikörpers eingesetzt.

Proben, die gemäss Beispiel 4 durch zweimalige TNF- α -
-Ligandenaffinitätschromatographie des Durchlaufs der Immun-
affinitätschromatographie erhalten und durch HPLC gemäss
10 Beispiel 5 weiter aufgetrennt worden waren, zeigten unter
den oben spezifizierten SDS-PAGE- und Blottransfer-Bedingungen zwei zusätzliche Banden von 75 kD und 65 kD, die
beide im Filtertest (Beispiel 1) spezifisch TNF banden. Im
Western Blot gemäss Towbin et al. (s.o.) reagierten die
15 Proteine dieser beiden Banden nicht mit dem gemäss Beispiel
3 hergestellten anti-(55 kD TNF-BP)-Antikörper. Sie reagierten
allerdings mit einem monoklonalen Antikörper, der
ausgehend von der 75 kD-Bande (anti-75 kD TNF-BP-Antikörper)
gemäss Beispiel 3 erzeugt worden war.

20

Beispiel 7

Aminosäuresequenzanalyse

25 Zur Aminosäuresequenzanalyse wurden die gemäss Beispiel
5 erhaltenen und gemäss Filtertest (Beispiel 1) aktiven
Fraktionen mittels der in Beispiel 6 beschriebenen, nun
jedoch reduzierenden, SDS-PAGE Bedingungen (SDS-Probenpuffer
mit 125 mM Dithiothreitol) aufgetrennt. Es wurden die
30 gleichen Banden wie gemäss Beispiel 6 gefunden, die allerdings
auf Grund der reduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE
im Vergleich zu Beispiel 6 alle um etwa 1-2 kD höhere
Molekulargewichte zeigten. Diese Banden wurden dann gemäss
Beispiel 6 auf PVDF-Membranen übertragen und mit 0,15%
35 Serva-Blau in Methanol/Wasser/Eisessig (50/40/10 Volumenteile)
während 1 Minute gefärbt, mit Methanol/Wasser/Eisessig
(45/48/7 Volumenteile) entfärbt, mit Wasser gespült,

luftgetrocknet und danach ausgeschnitten. Bei sämtlichen Schritten wurden zur Vermeidung von N-terminaler Blockierung die von Hunkapiller [34] angegebenen Bedingungen eingehalten. Zunächst wurden die gereinigten TNF-BP unverändert zur Aminosäuresequenzierung eingesetzt. Um zusätzliche Sequenzinformation zu erhalten, wurden die TNF-BP nach Reduktion und S-Carboxymethylierung [Jones, B.N. (1986) in "Methods of Protein Microcharacterisation", J.E. Shively, ed., Humana Press, Clifton NJ, 124-125] mit Bromcyan (Tarr, G.E. in "Methods of Protein Microcharacterisation", 165-166, op.cit.), Trypsin und/oder Proteinase K gespalten und die Peptide mittels HPLC nach bekannten Methoden der Proteinchemie aufgetrennt. So vorbereitete Proben wurden dann in einem automatisierten Gasphasen-Mikrosequenzier-Gerät (Applied Biosystems Modell 470A, ABI, Foster City, Calif., USA) mit einem on-line nachgeschalteten automatisierten HPLC PTH-Aminosäureanalysator (Applied Biosystems Modell 120, ABI s.o.) sequenziert, wobei die folgenden Aminosäuresequenzen bestimmt wurden:

1., Für die 55 kD-Bande (gemäss nichtreduzierender SDS-PAGE):
 Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu-Lys-Arg-Asp-Ser-Val-
 Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-X-Asn-Ser-Ile,
 und
 Ser-Thr-Pro-Glu-Lys-Glu-Gly-Glu-Leu-Glu-Gly-Thr-Thr-Thr-
 Lys
 wobei X für einen Aminosäurerest steht, der nicht bestimmt werden konnte.

2., Für die 51 kD und die 38 kD-Banden (gemäss nichtreduzierender SDS-PAGE):
 Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu

3., Für die 65 kD-Bande (gemäss nichtreduzierender SDS-PAGE):
 Bei der N-terminalen Sequenzierung der 65 kD Bande wurden bis zum 15. Rest ohne Unterbrechung zwei parallele Sequenzen ermittelt. Da eine der beiden

5 Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-X-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-
Ser-Thr-Cys.

10. Weitere Peptidsequenzen für 75(65)kDa-TNF-BP wurden bestimmt:

15 Ser-Gln-Leu-Glu-Thr-Pro-Glu-Thr-Leu-Leu-Gly-Ser-Thr-Glu-
Glu-Lys-Pro-Leu

Val-Phe-Cys-Thr

20 Asn-Gln-Pro-Gln-Ala-Pro-Gly-Val-Glu-Ala-Ser-Gly-Ala-Gly-
Glu-Ala

Leu-Cys-Ala-Pro

25 Val-Pro-His-Leu-Pro-Ala-Asp

Gly-Ser-Gln-Gly-Pro-Glu-Gln-Gln-X-X-Leu-Ile-X-Ala-Pro

30 bestimmt werden konnte.

Bestimmung von Basen-Sequenzen von komplementärer DNA (cDNA)

Ausgehend von der Aminosäuresequenz gemäss Formel IA wurden unter Berücksichtigung des genetischen Codes zu den

Aminosäureresten 2-7 und 17-23 entsprechende, vollständig degenerierte Oligonucleotide in geeigneter Komplementarität synthetisiert ("sense" and "antisense" Oligonucleotide). Totale zelluläre RNA wurde aus HL60-Zellen isoliert [42, 43], und der erste cDNA-Strang durch Oligo-dT-Priming oder durch Priming mit dem "antisense" Oligonucleotid mittels eines cDNA-Synthese-Kits (RPN 1256, Amersham, Amersham, England) gemäss der Anleitung des Herstellers synthetisiert. Dieser cDNA-Strang und die beiden synthetisierten degenerierten "sense" und "anti-sense" Oligonucleotide wurden in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA gemäss Anleitung des Herstellers) dazu verwendet, die für die Aminosäure-Reste 8-16 (Formel IA) codierende Basesequenz als cDNA-Fragment zu synthetisieren. Die Basensequenz dieses cDNA-Fragmentes lautet: 5'-AGGGAGAAGAGAGATAGTGTGTGTCCC-3'. Dieses cDNA-Fragment wurde als Probe verwendet, um nach bekannten Verfahren einen für das 55 kD TNF-BP codierenden cDNA-Klon in einer λ gt11-cDNA-Genbank von menschlicher Placenta zu identifizieren (42,43). Dieser Klon wurde dann nach üblichen Methoden aus dem λ -Vektor geschnitten und in die Plasmide pUC18 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) und pUC19 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) und in die M13mpl8/M13mpl9 Bacteriophagen (Pharmacia, Uppsala, Sweden) kloniert (42,43). Die Nukleotidsequenz dieses cDNA-Klons wurde mit einem Sequenase-Kit (U.S. Biochemical, Cleveland, Ohio, USA) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Die Nukleotidsequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz für das 55 kD TNF-BP und dessen Signalpeptid (Aminosäure "-28" bis Aminosäure "0") ist in Figur 1 mittels der im Stand der Technik üblichen Abkürzungen für Basen wie Aminosäuren dargestellt. Aus Sequenzvergleichen mit anderen, bereits bekannten Rezeptorproteinsequenzen lassen sich ungefähr 180 Aminosäuren enthaltende N-terminale wie 220 Aminosäure enthaltende C-terminale Domänen, die von einer nach den Sequenzvergleichen typischen Transmembran-Region von 19 Aminosäuren (in Figur 1 unterstrichen) getrennt werden,

20

35

5' -AAGCTTGGCCAGGATCCAGCTGACTGACTGATCGCGAGATC-3'
3' -TTCGAACCGGTCCTAGGTCGACTGACTGACTAGCGCTCTAG-5'

Hinter diesen Schnittstellen befinden sich drei Transla-
tions-Stopcodons in allen drei Leserastern. Hinter der Poly-
linkersequenz befindet sich das 2. Intron und das Polyadeny-
lierungssignal des Präproinsulins der Ratte (Lomedico et
5 al., Cell 18, 545-558, 1979). Das Plasmid enthält ferner den
Replikationsursprung des SV40 Virus sowie ein Fragment aus
pBR322, das E. coli-Bakterien Ampicillin-Resistenz verleiht
und die Replikation des Plasmids in E. coli ermöglicht.

10 Zur Konstruktion des Expressionsvektors "pN123" wurde
dieses Plasmid "pN11" mit der Restriktionsendonuklease PvuII
geschnitten und anschliessend mit alkalischer Phosphatase
behandelt. Der dephosphorylierte Vektor wurde danach aus
einem Agarosegel isoliert (V1). Die 5'-überhängenden Nukleo-
15 tide des EcoRI-geschnittenen 1,3kb-Fragments der 55 kD
TNF-BP-cDNA (siehe Beispiel 8) wurden mit Hilfe von Klenow-
-Enzym aufgefüllt. Anschliessend wurde dieses Fragment aus
einem Agarosegel isoliert (F1). Danach wurden V1 und F1
mittels T4-Ligase miteinander verbunden. E. coli HB101-Zel-
20 len wurden dann mit diesem Ligierungsansatz nach bekannten
Methoden [42] transformiert. Mit Hilfe von Restriktions-
analysen und DNA-Sequenzierung nach bekannten Methoden [42]
wurden Transformanten identifiziert, die mit einem Plasmid
transformiert worden waren, welches das 1,3kb EcoRI-Fragment
25 der 55 kD TNF-BP-cDNA in der für die Expression über den
HCMV-Promotor korrekten Orientierung enthielt. Dieser Vektor
erhielt die Bezeichnung "pN123".

Zur Konstruktion des Vektors "pK19" wurde folgender-
30 massen verfahren. Ein DNA-Fragment, welches nur die für den
extrazellulären Teil des 55 kD TNF-BP codierende cDNA
enthält (Aminosäuren -28 bis 182 gemäss Figur 1) wurde
mittels PCR-Technologie erhalten (Saiki et al., Science 230,
1350-1354, 1985, siehe auch Beispiel 8). Die folgenden
35 Oligonukleotide wurden, um die für den extrazellulären Teil
des 55 kD TNF-BP codierende cDNA aus "pN123" zu amplifi-
zieren, verwendet:

BAMHI

5'-CACAGGGATCCATAGCTGTCTGGCATGGGCCTCTCCAC-3'

ASP718

5 3'-CGTGACTCCTGAGTCCGTGGTGTATTATCTCTAGACCATGGCCC-5'

Durch diese Oligonukleotide wurden ebenfalls zwei Stopkodons der Translation hinter Aminosäure 182 eingeführt. Das so amplifizierte DNA-Fragment wurde mit BamHI und Asp718 geschnitten, die hierbei entstandenen überstehenden Enden mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt und dieses Fragment anschliessend aus einem Agarosegel isoliert (F2). F2 wurde dann mit V1 ligiert und der gesamte Ansatz zur Transformation von E. coli HB101, wie bereits beschrieben, verwendet. Transformanten, die mit einem Plasmid transformiert worden waren, welches das DNA-Fragment in der für die Expression über den HCMV-Promotor korrekten Orientierung enthielten, wurden mittels DNA-Sequenzierung (s.o.) identifiziert. Das daraus isolierte Plasmid erhielt die Bezeichnung "pK19".

20

Transfektion der CQS-Zellen mit den Plasmiden "pN123" oder "pK19" wurde nach der von Felgner et al. veröffentlichten Lipofections-Methode (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417, 1987) durchgeführt. 72 Stunden nach erfolgter Transfektion wurden die mit "pN123" transfizierten Zellen nach bekannten Methoden mit ¹²⁵I-TNF α auf Bindung analysiert. Das Resultat der Scatchard-Analyse [Scatchard, G., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660, 1949] der so erhaltenen Bindungsdaten (Figur 2A) ist in Figur 2B dargestellt. Die Kulturüberstände der mit "pK19" transfizierten Zellen wurden in einem "Sandwich"-Test untersucht. Dazu wurden PVC-Microtiterplatten (Dynatech, Arlington, VA, USA) mit 100 μ l/Loch eines Kaninchen-anti-Maus Immunglobulins (10 μ g/ml PBS) sensibilisiert. Anschliessend wurde die Platte gewaschen und mit einem anti-55 kD TNF-BP-Antikörper, der gemäss Beispiel 3 durch seine Antigenbindung nachgewiesen und isoliert wurde, der aber die TNF-Bindung an

Zellen nicht inhibiert, inkubiert (3 Stunden, 20°C). Die Platte wurde dann wieder gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 100 µl/Loch der Kulturüberstände (1:4 verdünnt mit 1% entfetteter Milchpulver enthaltendem Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.02% Na-Azid) inkubiert. Die Platte wurde entleert und mit ¹²⁵I-TNFα enthaltendem Puffer A (10⁶ cpm/ml, 100 µl/Loch) mit oder ohne Zusatz von 2 µg/ml unmarkiertem TNF während 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Platte 4 mal mit PBS gewaschen, die einzelnen Löcher wurden ausgeschnitten und in einem γ-Zähler gemessen. Die Resultate von 5 parallelen Transfektionen (Säulen # 2, 3, 4, 6 und 7), von zwei Kontroll-Transfektionen mit dem pN11-Vektor (Säulen # 1, 5) und von einer Kontrolle mit HL60-Zell-Lysat (Säule # 8) sind in Figur 3 dargestellt.

Beispiel 10

Expression in Insektenzellen

Für die Expression in einem Baculovirus-Expressionssystem wurde von dem Plasmid "pVL941" (Luckow und Summers, 1989, "High Level Expression of Nonfused Foreign Genes with Autographa californica Nuclear Polyhedrosis virus Expression Vectors", Virology 170, 31-39) ausgegangen und dieses folgendermassen modifiziert. Es wurde die einzige EcoRI-Restriktionsschnittstelle in "pVL941" entfernt, indem das Plasmid mit EcoRI geschnitten und die überstehenden 5'-Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt wurden. Das hieraus erhaltene Plasmid pVL941/E- wurde mit BamHI und Asp718 verdaut und der Vektorrumpf anschliessend aus einem Agarosegel isoliert. Dieses Fragment wurde mit einem synthetischen Oligonukleotid der folgenden Sequenz ligiert:

35	BamHI EcoRI Asp718
	5' - GATCCAGAATTCATAATAG - 3'
	3' - GTCTTAAGTATTATCCATG - 5'

Zur Konstruktion des Transfervektors "pN119" wurde folgendermassen vorgegangen. Das 1,3 kb EcoRI/EcoRI-Fragment der 55 kD TNF-BP cDNA in dem "pUC19"-Plasmid (siehe Beispiel 8) wurde mit BanI verdaut und mit dem folgenden synthetischen Oligonukleotid ligiert:

25

30

sion integriert worden war, erfolgte wie bereits beschrieben. Das aus diesen Transformanten isolierte Plasmid erhielt den Namen "pN119".

5 Zur Konstruktion des Transfervektors "pN124" wurde folgendermassen vorgegangen. Das in Beispiel 9 beschriebene, für den extrazellulären Teil des 55 kD TNF-BP codierende cDNA-Fragment wurde mit den angegebenen Oligonukleotiden mit Hilfe der PCR-Technologie, wie in Beispiel 9 beschrieben, 10 amplifiziert. Dieses Fragment wurde mit BamHI und Asp718 geschnitten und aus einem Agarosegel isoliert (F4). Das Plasmid "pNR704" wurde ebenfalls mit BamHI und Asp718 geschnitten und der Vektorrumpf (V4) wurde isoliert (s.o.). Die Fragmente V4 und F4 wurden ligiert, E. coli HB101 damit 15 transformiert und der rekombinante Transfervektor "pN124" wurde, wie beschrieben, identifiziert und isoliert.

Zur Transfektion der Insektenzellen wurde folgendermassen vorgegangen. 3 µg des Transfervektors "pN113" 20 wurden mit 1 µg DNA des Autographa californica-Nukleopolyhedrosisvirus (AcMNPV) (EP 127839) in Sf9-Zellen (ATCC CRL 1711) transfektiert. Polyhedrin negative Viren wurden identifiziert und aus "Plaques" gereinigt [52]. Mit diesen rekombinanten Viren wurden wiederum Sf9 Zellen wie in [52] 25 beschrieben, infiziert. Nach 3 Tagen in Kultur wurden die infizierten Zellen auf Bindung von TNF mittels ¹²⁵I-TNFα untersucht. Dazu wurden die transfektierten Zellen mit einer Pasteurpipette von der Zellkulturschale abgewaschen und bei einer Zelldichte von 5x10⁶ Zellen/ml Kulturmedium [52], 30 das 10 ng/ml ¹²⁵I-TNF-α enthielt, sowohl in Anwesenheit wie Abwesenheit von 5 µg/ml nichtmarkiertem TNF-α resuspendiert und 2 Stunden auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit reinem Kulturmedium gewaschen und die zellgebundene Radioaktivität in einem γ-Zähler gezählt (siehe 35 Tabelle 2).

00-0015 M

- 34 -

Tabelle 2

Zellen	Zellgebundene Radioaktivität
	pro 10^6 Zellen
5 nichtinfizierte Zellen	60 cpm
(Kontrolle)	
infizierte Zellen	1600 ± 330 cpm ¹⁾
10 ¹⁾ Mittelwert und Standardabweichung aus 4 Experimenten	

15

20

25

30

35

Literatur

1. G.E. Nedwin, S.L. Naylor, A.Y. Sakaguchi, D. Smith, J. Jarrett-Nedwin, D. Pennica, D.V. Goeddel and P.W. Gray:
5 Nucl. Acids Res. 13, 6361, 1985
2. B. Beutler and A. Cerami: New England J. Med. 316, 379, 1987
3. L.J. Old: Science 230, 630, 1985
4. G. Trinchieri, M. Kobayashi, M. Rosen, R. Loudon, M. Murphy and B. Perussia: J. exp. Med. 164, 1206, 1986
- 10 5. J. Vilcek, V.J. Palombella, D. Henriksen-de Stefano, C. Swenson, R. Feinman, M. Hirai and M. Tsujimoto: J. exp. Med. 163, 632, 1986
6. B.J. Sugarman, B.B. Aggarwal, P.E. Hass, I.S. Figari, M.A. Palladino and H.M. Shepard: Science 230, 943, 1985
- 15 7. J.R. Gamble, J.M. Harlan, S.J. Klebanoff and M.A. Vadas: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 8667, 1985
8. N. Sato, T. Goto, K. Haranaka, N. Satomi, H. Nariuchi, Y. Mano and Y. Sawasaki: J. Natl. Cancer Inst. 76, 1113, 1986
- 20 9. A.H. Stolpen, E.C. Guinan, W. Fiers and J.S. Pober: Am. J. Pathol. 123, 16, 1986
10. J.S. Pober, L.A. Lapierre, A.H. Stolpen, T.A. Brock, T.A. Springer, W. Fiers, M.P. Bevilacqua, D.L. Mendrick and M.A. Gimbrone: J. Immunol. 138, 3319, 1987
- 25 11. M. Kawakami, P. Pekala, M. Lane and A. Cerami: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 912, 1982
12. T. Collins, L.A. Lapierre, W. Fiers, J.L. Strominger and J.S. Pober: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 446, 1986
- 30 13. G.H.W. Wong and D.V. Goeddel: Nature 323, 819, 1986
14. J.W. Lowenthal, D.W. Ballard, E. Böhnelein and W.C. Greene: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2331, 1989
15. M.J. Lenardo, C.M. Fan, T. Maniatis and D. Baltimore: Cell 57, 287, 1989
- 35 16. A.E. Goldfeld and T. Maniatis: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1490, 1989

17. A. Waage, A. Halsteuren and T. Espevik: Lancet, Febr.
14, 1987, 355.
18. C.O. Jacob and H.O. McDevitt: Nature 331, 356, 1988
19. G.E. Grau, L.F. Fajardo, P. Piguet, B. Allet, P. Lambert
and P. Vassalli: Science 237, 1210, 1987
20. B. Beutler, I.W. Milsark and A.C. Cerami: Science 229,
869, 1985
21. B.B. Aggarwal, T.E. Eessalu and P.E. Hass: Nature 318,
665, 1985
22. M. Tsujimoto, Y.K. Yip and J. Vilcek: Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 82, 7626, 1985
23. C. Baglioni, S. McCandless, J. Tavernier and W. Fiers:
J. Biol. Chem. 260, 13395, 1985
24. P. Hohmann, R. Remy, M. Brockhaus and A.P.G.M. van Loon:
J. Biol. Chem., im Druck
25. F.C. Kull, S. Jacobs and P. Cuatrecasas: Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 82, 5756, 1985
26. A.A. Creasy, R. Yamamoto and Ch.R. Vitt: Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 84, 3293, 1987
27. G.B. Stauber, R.A. Aiyer and B.B. Aggarwal: J. Biol.
Chem. 263, 19098, 1988
28. K. Hirano, K. Yamamoto, Y. Kobayashi and T. Osawa: J.
Biochem. 105, 120, 1989
29. Y. Niitsu, N. Watanabe, H. Sone, H. Neda, N. Yamauchi,
M. Maeda and I. Urushizaki: J. Biol. Resp. Modifiers 7,
276, 1988
30. I. Olsson, A. Grubb, U. Gullberg, M. Lantz, E. Nilsson,
C. Peetre and H. Thysell: Abstract, 2nd Intern.
Conference on Tumor Necrosis Factor and Related
Cytokines, Napa, California, 15.-20. Januar 1989
31. H.R. Lötscher and M. Brockhaus: Abstract, 2nd Intern.
Conference on Tumor Necrosis Factor and Related
Cytokines, Napa, California, 15.-20. Januar 1989
32. M. Brockhaus, H. Lötscher, H.-P. Hohmann und
W. Hunziker: Abstract, 2nd Intern. Conference on Tumor
Necrosis Factor and Related Cytokines, Napa, California,
15.-20. Januar 1989

33. C.R. Cantor and P.R. Schimmel, in Biophysical Chemistry, W.H. Freeman, ed., San Francisco, 1980, p. 850
34. M.W. Hunkapiller, E. Lujan, F. Ostrander, L.E. Hood: Methods Enzymol. 91, 227, 1983
- 5 35. U.K. Lämmli: Nature 227, 680, 1970
36. T.St. John, W.M. Gallatin, M. Siegelman, H.T. Smith, V.A. Fried and I.L. Weissman: Science 231, 845, 1986
37. M. Siegelman, M.W. Bond, W.M. Gallatin, T.St. John, H.T. Smith, V.A. Fried and I.L. Weissman: Science 231, 823, 1986
- 10 38. H. Towbin, T. Staehelin and J. Gordon: Proc. Natl. Acad.Sci. USA 76, 4350, 1979
39. Dinarello, Ch.A., in Lymphokines, Vol. 14, E. Pick, ed., p. 1, Academic Press, London, 1987
- 15 40. D.J. Merchant, R.H. Kahn and W.H. Murphy: Handbook of Cell and Organ Culture, Burgess Publ. Co., Minneapolis, 1969
41. G.E. Grau, T.E. Taylor, M.E. Molyneux, J.J. Wirima, P. Vassalli, M. Hommel and P. Lambert: New Engl. J. Med. 320, 1586, 1989
- 20 42. J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 25 43. F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman and K. Struhl: Current Protocols in Molecular Biology 1987-1988, S. Wiley and Sons, New York, 1987
44. E. Harlow and D. Lane: Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Publications, New York, 1988
- 30 45. S.Fazekas de St. Groth and D. Scheidegger: J. Immunol. Methods 35, 1, 1980
46. D. Pennica and D.V. Goeddel, in Lymphokines, Vol. 13, D.R. Webb and D.V. Goeddel, eds. p. 163, Academic Press, London, 1987
- 35

00-60-15 M

- 38 -

47. J. Tavernier, L. Franzen, A. Marmenout, J. van der
Heyden, R. Muller, M. Ruysschaert, A. van Vliet, R.
Banden and W. Fiers, in Lymphokines, Vol. 13, D.R. Webb
and D.V. Goeddel, eds., p. 181, Academic Press, London
- 5 48. P.J. Fraker and J.C. Speck: Biochem. Biophys. Res.
Commun. 80, 849, 1987
49. D.H. Erlich, D.H. Gelfand, R.K. Saiki: Nature 331, 61,
1988
50. Bosserhoff, J. Wallach and R.W. Frank: J. Chromatogr.
10 473, 71, 1989
51. R. Lathe: J. Mol. Biol. 183, 1, 1985
52. Luckow and Summers, "A Manual of Methods for Baculovirus
Vectors and Insect Cell Culture Procedures", Texas
Agricultural Experimental Station, Texas A & M
15 University, Bulletin Nr. 1555, 2nd edition, 1988

20

25

30

35

Patentansprüche

1. Nichtlösliche Proteine und lösliche oder nicht-
lösliche Fragmente davon, die TNF binden, in homogener Form,
5 sowie deren physiologisch verträgliche Salze.

2. Verbindungen gemäss Anspruch 1, die durch Molekular-
gewichte gemäss SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Be-
dingungen von etwa 55 kD und 75 kD charakterisiert sind.

10 3. Verbindungen gemäss einem der Ansprüche 1 und 2, die
wenigstens eine der folgenden Aminosäuresequenzen enthalten:

Leu-Val-Pro-His-Leu-Gly-Asp-Arg-Glu-Lys-Arg-Asp-Ser-Val-Cys-
15 Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-X-Asn-Ser-Ile;

Ser-Thr-Pro-Glu-Lys-Glu-Gly-Glu-Leu-Glu-Gly-Thr-Thr-Thr-Lys;

Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-X-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-
20 Gly-Ser-Thr-Cys;

Ile-X-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Ala-Tyr-Pro-Ala-Leu-Glu;

Ser-Gln-Leu-Glu-Thr-Pro-Glu-Thr-Leu-Leu-Gly-Ser-Thr-Glu-
25 Glu-Lys-Pro-Leu;

Val-Phe-Cys-Thr;

Asn-Gln-Pro-Gln-Ala-Pro-Gly-Val-Glu-Ala-Ser-Gly-Ala-Gly-
30 Glu-Ala;

Leu-Cys-Ala-Pro;

~~Val-Pro-His-Leu-Pro-Ala-Asp;~~

35

Gly-Ser-Gln-Gly-Pro-Glu-Gln-Gln-X-X-Leu-Ile-X-Ala-Pro

wobei X für einen nicht bestimmten Aminosäurerest steht.

4. Ein Verfahren zur Isolierung einer Verbindung gemäss einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, dass man im wesentlichen die folgenden Reinigungsschritte nacheinander ausführt: Herstellung eines Zellextraktes, Immunaффinitätschromatographie und/oder ein- oder mehrfache Ligandenaffinitätschromatographie, HPLC und präparative SDS-PAGE.

5. Pharmazeutische Präparate, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine oder mehrere Verbindung(en) gemäss einem der Ansprüche 1-3, gewünschtenfalls in Kombination mit weiteren pharmazeutisch wirksamen Substanzen und/oder nicht-toxischen, inerten, therapeutisch verträglichen Trägermaterialien enthalten.

6. Verwendung einer Verbindung gemäss einem der Ansprüche 1-3 zur Herstellung pharmazeutischer Präparate bzw. zur Behandlung von Krankheiten, bevorzugt solchen, bei denen TNF involviert ist.

7. Gegen eine Verbindung gemäss Ansprüche 1-3 gerichtete Antikörper.

8. DNA-Sequenzen, die für Proteine und lösliche oder nichtlösliche Fragmente davon, die TNF binden, kodieren.

9. Von DNA-Sequenzen gemäss Anspruch 8 kodierte rekombinante Proteine.

10. Vektoren, die DNA-Sequenzen gemäss Anspruch 8 enthalten und zur Expression der von diesen DNA-Sequenzen kodierten Proteinen in prokaryotischen- wie eukaryotischen Wirtssystemen geeignet sind.

4310890

- 41 -

11. Prokaryotische- wie eukaryotische Wirtssysteme, die mit einem Vektor gemäss Anspruch 10 transformiert worden sind.

5 12. Ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen gemäss Anspruch 9, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man ein wie in Anspruch 11 beanspruchtes transformiertes Wirtssystem in einem geeigneten Medium kultiviert und aus dem Wirtssystem selbst oder dem Medium solche Verbindungen
10 isoliert.

15

20

25

30

35

-185 GAATTCGGGGGGGTTCAAGATCACTGGGACCAGGCCGTGATCTCTATGCCCGAGTCTCAA
-125 CCCTCAACTGTCACCCCAAGGCACTTGGGACGTCTGGACAGACCGAGTCCCGGAAGCC
-65 CCAGCACTGCCGCTGCCACACTGCCCTGAGCCCAATGGGGGAGTGAGAGGCCATAGCTG
-28.
-30 MetGlyLeuSerThrValProAspLeuLeuLeuProLeuValLeuLeuGluLeu
-5 TCTGGCATGGGCCTCTCCACCGTGCCTGACCTGCTGCTGCCGCTGGTGCTCCTGGAGCTG
+1
-10 LeuValGlyIleTyrProSerGlyValIleGlyLeuValProHisLeuGlyAspArgGlu
55 TTGGTGGGAATATACCCCTCAGGGGTATTGGACTGGTCCCTCACCTAGGGGACAGGGAG

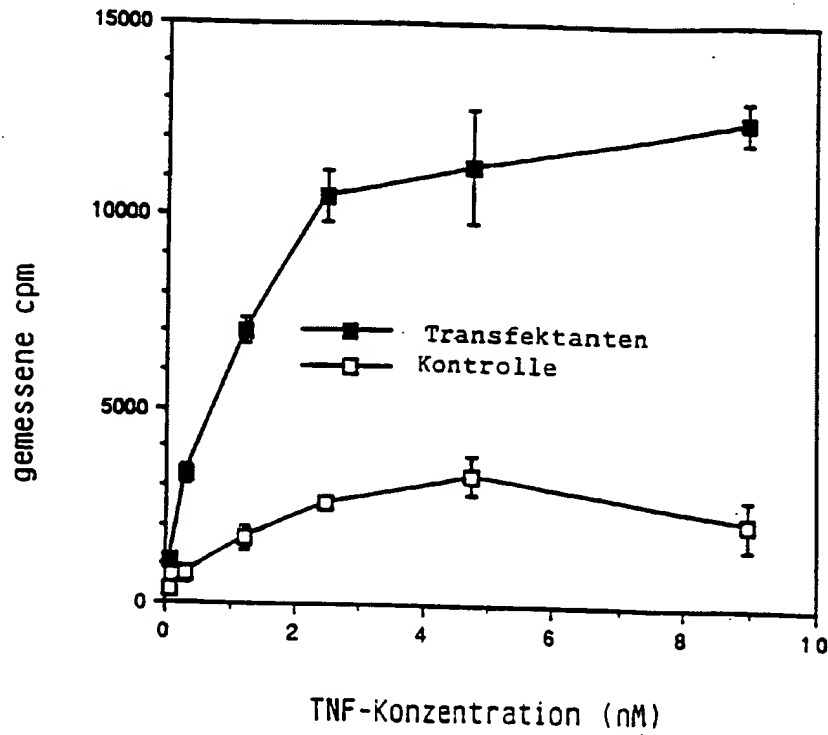
10 LysArgAspSerValCysProGlnGlyLysTyrIleHisProGlnAsnAsnSerIleCys
115 AAGAGAGATAGTGTGTGTCCCAAGGAAATATATCCACCTCAAATAATTCTGATTTC
30 CysThrLysCysHisLysGlyThrTyrLeuTyrAsnAspCysProGlyProGlyGlnAsp
175 TGTACCAAGTGCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGGAGGAT
50 ThrAspCysArgGluCysGluSerGlySerPheThrAlaSerGluAsnHisLeuArgHis
235 ACGGACTGCAGGGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACCTCAGACAC
70 CysLeuSerCysSerLysCysArgLysGluMetGlyGlnValGluIleSerSerCysThr
295 TGCCTCAGCTGCTCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTGAGGTGGAGATCTCTTCTGCACA
90 ValAspArgAspThrValCysGlyCysArgLysAsnGlnTyrArgHisTyrTrpSerGlu
355 GTGGACCGGGACACCGTGTGTGGCTGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGGAGTGAA

110 AsnLeuPheGlnCysPheAsnCysSerLeuCysLeuAsnGlyThrValHisLeuSerCys
415 AACCTTTTCCAGTGCTTCAATTGCAGCCTCTGCCTCAATGGGACCGTGCACCTCTCCTGC
130 GlnGluLysGlnAsnThrValCysThrCysHisAlaGlyPhePheLeuArgGluAsnGlu
475 CAGGAGAAACAGAACCCGTGTGCACCTGCCATGCAGGTTTCTTTCTAAGAGAAAACGAG
150 CysValSerCysSerAsnCysLysLysSerLeuGluCysThrLysLeuCysLeuProGln
535 TGTGTCTCCTGTAGTAAGTAAAGAAAGCCTGGAGTGCACGAAGTTGTGCCTACCCAG
170 IleGluAsnValLysGlyThrGluAspSerGlyThrThrValLeuLeuProLeuValIle
595 ATTGAGAATGTTAAGGGCACTGAGGACTCAGGCACCACAGTGTGTTGCCCTGGTCATT
190 PhePheGlyLeuCysLeuLeuSerLeuLeuPheIleGlyLeuMetTyrArgTyrGlnArg
655 TTCTTTGGTCTTTGCCTTTTATCCCTCCTCTTCATTGGTTTAAATGTATCGCTACCAACGG
210 TrpLysSerLysLeuTyrSerIleValCysGlyLysSerThrProGluLysGluGlyGlu
715 TGGAAGTCCAAGCTCTACTCCATTGTTGTGGGAAATCGACACCTGAAAAAGAGGGGGAG

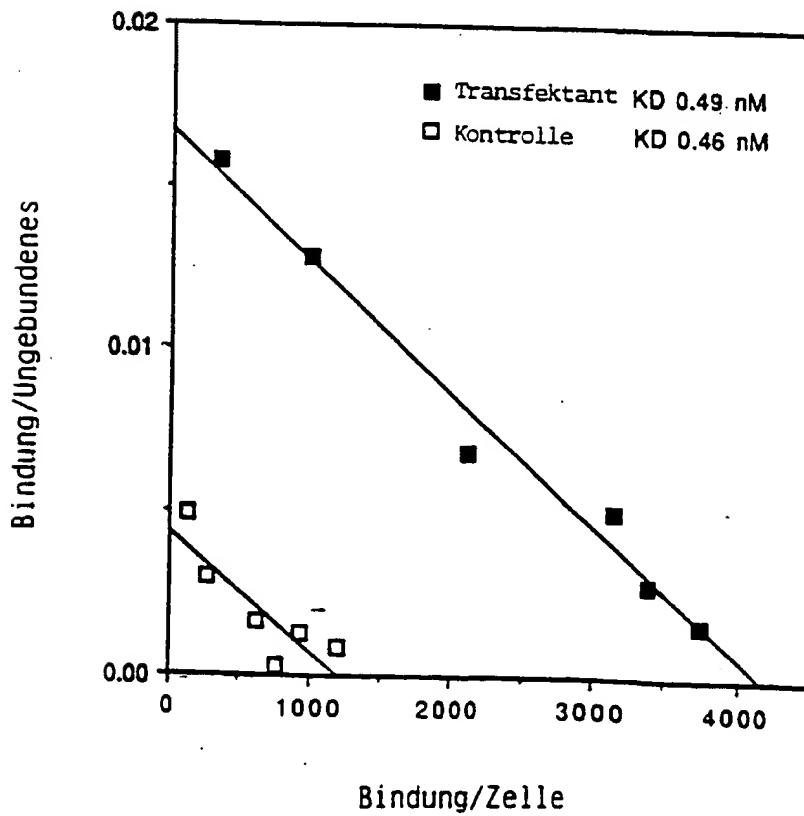
230 LeuGluGlyThrThrThrLysProLeuAlaProAsnProSerPheSerProThrProGly
775 CTTGAAGGAACCTACTAAGCCCTGGCCCCAAACCAAGCTTCAGTCCCACTCCAGGC
250 PheThrProThrLeuGlyPheSerProValProSerSerThrPheThrSerSerSerThr
835 TTCACCCCAACCTGGGCTTCAGTCCCGTCCCAGTTCACCTTCACCTCCAGTCCACC
270 TyrThrProGlyAspCysProAsnPheAlaAlaProArgArgGluValAlaProProTyr
895 TATACCCCGGTGACTGTCCCAACTTTGGCGCTCCCCGACAGAGGTGGCACCACCTAT
290 GlnGlyAlaAspProIleLeuAlaThrAlaLeuAlaSerAspProIleProAsnProLeu
955 CAGGGGGCTGACCCCATCCTTGCAGACAGCCCTCGCCTCCGACCCCATCCCAACCCCTT

310 GlnLysTrpGluAspSerAlaHisLysProGlnSerLeuAspThrAspAspProAlaThr
1015 CAGAAGTGGGAGGACAGCGCCCAAGCCACAGAGCCTAGACACTGATGACCCCGCGACG
330 LeuTyrAlaValValGluAsnValProProLeuArgTrpLysGluPheValArgArgLeu
1075 CTGTACGCCGTGGTGGAGAACGTGCCCCGTGCGCTGGAAGGAATTCGTGCGGCGCCTA
350 GlyLeuSerAspHisGluIleAspArgLeuGluLeuGlnAsnGlyArgCysLeuArgGlu
1135 GGGCTGAGCGACCACGAGATCGATCGGCTGGAGCTGCAGAACGGGCGCTGCCTGCGCGAG
370 AlaGlnTyrSerMetLeuAlaThrTrpArgArgArgThrProArgArgGluAlaThrLeu
1195 GCGCAATACAGCATGCTGGCGACCTGGAGGCGGCGCACGCCGCGGCGGAGGCCACGCTG
390 GluLeuLeuGlyArgValLeuArgAspMetAspLeuLeuGlyCysLeuGluAspIleGlu
1255 GAGCTGCTGGGACGCGTGCTCCGCGACATGGACCTGCTGGGCTGCCTGGAGGACATCGAG
410 GluAlaLeuCysGlyProAlaAlaLeuProProAlaProSerLeuLeuArg
1315 GAGGCGCTTTGCGGCCCCGCGCCCTCCCGCCCCGCGCCAGTCTTCTCAGATGAGGCTGC
1375 GCCCCTGCGGGCAGCTCTAAGGACCGTCCCTGCGAGATCGCCTTCCAACCCCACTTTTTTC
1435 TGGAAAGGAGGGGTCTGCAGGGGCAAGCAGGAGCTAGCAGCCGCCTACTTGGTGCTAAC
1495 CCTCGATGTACATAGCTTTTCTCAGCTGCCTGCGCGCCGCGACAGTCAGCGCTGTGCG
1555 CGCGGAGAGAGGTGCGCGCTGGGCTCAAGAGCCTGAGTGGGTGGTTTTCGAGGATGAGGG
1615 ACGCTATGCCTCATGCCGTTTTGGGTGTCTCACCAGCAAGGCTGCTCGGGGGCCCCCTG
1675 GTTCGTCCCTGAGCCTTTTTCACAGTGCATAAGCAGTTTTTTTTGTGTTTTGTTTT
1735 GTTTTGTGTTTTAAATCAATCATGTTACACTAATAGAACTTGGCACTCCTGTGCCCTCTG
1795 CCTGGACAAGCACATAGCAAGCTGAAGTGTCTAAGGCAGGGGCGAGCACGGAACAATGG
1855 GGCCTTCAGCTGGAGCTGTGGACTTTTGTACATACACTAAATTCGAAGTTAAAAAAA
1915 AACCCGAATTC

Figur 2A



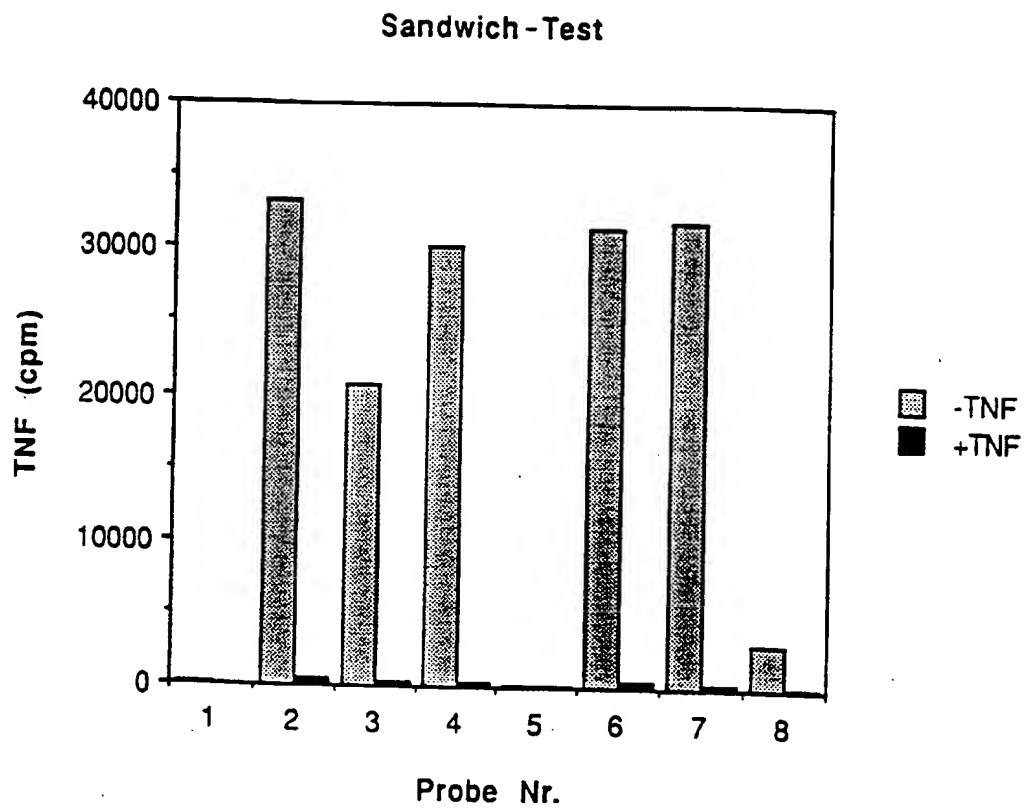
Figur 2B

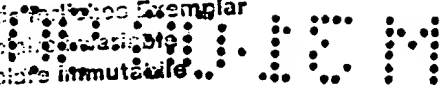


Exemplar
variable
Exemplar immutabile

M 31.08.90

Figur 3





Figur 4

1 SerAspSerValCysAspSerCysGluAspSerThrTyrThrGlnLeuTrpAsnTrpVal
 1 TCGGACTCCGTGTGTGACTCCTGTGAGGACAGCACATACACCCAGCTCTGGAACTGGGT
 21 ProGluCysLeuSerCysGlySerArgCysSerSerAspGlnValGluThrGlnAlaCys
 61 CCCGAGTGCTTGAGCTGTGGCTCCCGCTGTAGCTCTGACCAGGTGGAACTCAAGCCTGC
 41 ThrArgGluGlnAsnArgIleCysThrCysArgProGlyTrpTyrCysAlaLeuSerLys
 121 ACTCGGGAACAGAACCGCATCTGCACCTGCAGGCCCGGCTGGTACTGCGCGCTGAGCAAG
 61 GlnGluGlyCysArgLeuCysAlaProLeuProLysCysArgProGlyPheGlyValAla
 181 CAGGAGGGGTGCCGGCTGTGCGCGCCGCTGCCGAAGTGCCGCCCGGGCTTCGGCGTGGCC
 81 ArgProGlyThrGluThrSerAspValValCysLysProCysAlaProGlyThrPheSer
 241 AGACCAGGAACCTGAACATCAGACGTGGTGTGCAAGCCCTGTGCCCCGGGGACGTTCTCC
 101 AsnThrThrSerSerThrAspIleCysArgProHisGlnIleCysAsnValValAlaIle
 301 AACACGACTTCATCCACGGATATTTGCAGGCCCCACAGATCTGTACGTGGTGGCCATC
 121 ProGlyAsnAlaSerArgAspAlaValCysThrSerThrSerProThrArgSerMetAla
 361 CCTGGGAATGCAGGCAGGGATGCAGTCTGCACGTCCACGTCCCCACCCGGAGTATGGCC
 141 ProGlyAlaValHisLeuProGlnProValSerThrArgSerGlnHisThrGlnProSer
 421 CCAGGGGCAGTACACTTACCCAGCCAGTGTCCACACGATCCCAACACACGCAGCCAGT
 161 ProGluProSerThrAlaProSerThrSerPheLeuLeuProMetGlyProSerProPro
 481 CCAGARCCAGCACTGCTCCAGCACCTCCTTCTGCTCCCAATGGGCCCCAGCCCCCA
 181 AlaGluGlySerThrGlyAspPheAlaLeuProValGlyLeuIleValGlyValThrAla
 541 GCTGAGGGGAGCACTGGCGACTTCGCTCTCCAGTTGGACTGATTGTGGGTGTGACAGCC
 201 LeuGlyLeuLeuIleIleGlyValValAsnCysValIleMetThrGlnValLysLysLys
 601 TTGGGTCTACTAATAATAGGAGTGGTGAAGTGTGTCATCATGACCCAGGTGAAAAAGAG
 221 ProLeuCysLeuGlnArgGluAlaLysValProHisLeuProAlaAspLysAlaArgGly
 661 CCCTTGTGCCTGCAGAGAGAGCCAGGTGCCTCACTTGCCTGCCGATAGGCCCGGGGT
 241 ThrGlnGlyProGluGlnGlnHisLeuLeuIleThrAlaProSerSerSerSerSerSer
 721 ACACAGGGCCCCGAGCAGCAGCACCTGCTGATCACAGCGCCGAGCTCCAGCAGCAGCTCC
 261 LeuGluSerSerAlaSerAlaLeuAspArgArgAlaProThrArgAsnGlnProGlnAla
 781 CTGGAGAGCTCGGCCAGTGCCTTGGACAGAGGGCGCCCACTCGGAACAGCCACAGGCA

Figur 4. (Fortsetzung)

281 ProGlyValGluAlaSerGlyAlaGlyGluAlaArgAlaSerThrGlySerSerAlaAsp
841 CCAGGCGTGGAGGCCAGTGGGGCCGGGAGGCCCGGGCCAGCACCGGGAGCTCAGCAGAT
301 SerSerProGlyGlyHisGlyThrGlnValAsnValThrCysIleValAsnValCysSer
901 TCTTCCCCCTGGTGGCCATGGGACCCAGGTCAATGTCACCTGCATCGTGACGTCTGTAGC
321 SerSerAspHisSerSerGlnCysSerSerGlnAlaSerSerThrMetGlyAspThrAsp
961 AGCTCTGACCACAGCTCACAGTGCTCCTCCCAAGCCAGCTCCACAATGGGAGACACAGAT
341 SerSerProSerGluSerProLysAspGluGlnValProPheSerLysGluGluCysAla
1021 TCCAGCCCCCTCGGAGTCCCCGAAGGACGAGCAGGTCCCCCTTCTCCAAGGAGGAATGTGCC
361 PheArgSerGlnLeuGluThrProGluThrLeuLeuGlySerThrGluGluLysProLeu
1081 TTTGGTCCACAGCTGGAGACGCCAGAGACCCTGCTGGGGAGCACCGAAGAGAAGCCCCCTG
381 ProLeuGlyValProAspAlaGlyMetLysProSer
1141 CCCCTTGGAGTGCCTGATGCTGGGATGAGCCCAAGTTAACCAGGCCGGTGTGGGCTGTGT
1201 CGTAGCCAAAGGTGGCTGAGCCCTGGCAGGATGACCCTGCGAAGGGGCCCTGGTCCCTTCCA
1261 GGGCCCCACCACTAGGACTCTGAGGCTCTTTCTGGGCCAAGTTCTCTAGTGCCCTCCAC
1321 AGCCCGAGCCTCCCTCTGACCTGCAGGCCAAGAGCAGAGGCAGCGAGTTGTGGAAGCCT
1381 CTGCTGCCATGGCGTGTCCCTCTCGGAAGGCTGGCTGGGCATGGACGTTCTGGGGCATGCT
1441 GGGGCAAGTCCCTGAGTCTCTGTGACCTGCCCCGCCAGCTGCACCTGCCAGCCTGGCTT
1501 CTGGAGCCCTTGGGTTTTTTGTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTTCTCCCCCTGGGC
1561 TCTGCCAGCTCTGGCTTCCAGAAAACCCAGCATCCTTTTCTGCAGAGGGGCTTTCTGG
1621 AGAGGAGGGATGCTGCCTGAGTCACCCATGAGACAGGACAGTGCTTCAGCCTGAGGCTG
1681 AGACTGCGGGATGGTCTGGGGCTCTGTGCAGGGAGGAGGTGGCAGCCCTGTAGGGAAACG
1741 GGGTCCCTTCAAGTTAGCTCAGGAGGCTTGGAAAGCATCACCTCAGGCCAGGTGCAGTGGC
1801 TCACGCCTATGATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGGCGGGTGGATCACCTGAGGTTAGGA
1861 GTTCGAGACCAGCCTGGCCACATGGTAAACCCCATCTCTACTAAAAATACAGAAATTA
1921 GCCGGGCGTGGTGGCGGCACCTATAGTCCCAGCTACTCAGAAGCCTGAGGCTGGGAAT
1981 CGTTTGAACCCGGGAGCGGAGGTTCAGGGAGCCGAGATCACGCCACTGCACTCCAGCC
2041 TGGGCGACAGAGCGAGAGTCTGTCTCAAAGAAAAAAGCACCAGCCTCCAATGCT
2101 AACTTGTCTTTTGTACCATGGTGTGAAGTCAGATGCCAGAGGGGCCAGGCGCCAC
2161 CATATTCAAGTGTGTGGCCTGGGCAAGATAACGCACTTCTACTAGAAATCTGCCAATTT
2221 TTTAAAAAGTAAGTACCCTCAGGCCAACAGCCAACGACAAAGCCAACCTCTGCCAGC
2281 CACATCCAACCCCCACCTGCCATTTGCACCTCCGCCTTCACTCCGGTGTGCCTGCAG

This Page Blank (uspto)